






**THE USE OF INOSITOLTRISPHOSPHATE FOR THE PREPARING OF
MEDICAMENTS****Publication number:** JP10511677 (T)**Publication date:** 1998-11-10**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:****- international:** A61K9/08; A61K31/66; A61P35/00; C07F9/117; A61K9/08;
A61K31/66; A61P35/00; C07F9/00; (IPC1-7): A61K31/66;
A61K9/08**- European:** A61K31/6615; C07F9/117**Application number:** JP19950520899D 19951222**Priority number(s):** WO1995SE01585 19951222; SE19940004568 19941230**Also published as:** WO9620715 (A1) SE9404568 (L) EP0794786 (A1) EP0794786 (B1) DE69531554 (T2)[more >>](#)

Abstract not available for JP 10511677 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9620715 (A1)**The present invention relates to the use of inositoltrisphosphate (IP3) for the preparing of a
medicament with antimetastatic effects.Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-511677

(43) 公表日 平成10年(1998)11月10日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 31/66
9/08

識別記号

A D U

F I

A 6 1 K 31/66
9/08

A D U

F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願平8-520899
(86) (22) 出願日 平成7年(1995)12月22日
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997)6月27日
(86) 国際出願番号 P C T / S E 9 5 / 0 1 5 8 5
(87) 国際公開番号 W O 9 6 / 2 0 7 1 5
(87) 国際公開日 平成8年(1996)7月11日
(31) 優先権主張番号 9 4 0 4 5 6 8 - 9
(32) 優先日 1994年12月30日
(33) 優先権主張国 スウェーデン (S E)

(71) 出願人 ペルストルプ アーベ
スエーデン国 エス-284 80 ペルスト
ルプ (番地なし)
(72) 発明者 シーレン, マツツイ
フィンランド国 エフ・イー・ヘルシンフ
オツス 17 スネルマンスガータン 15
アー・4
(74) 代理人 弁理士 田中 浩 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イノシトール三リン酸の薬剤調製への使用

(57) 【要約】

この発明は、転移抑制効果を有する薬剤の調製にイノシ
トール三リン酸 (I P ₃) を使用することに関する。

【特許請求の範囲】

1. イノシトール三リン酸（ IP_3 ）の少なくとも1つの異性体の、転移抑制効果を有する薬剤の調製への使用。
2. イノシトール三リン酸（ IP_3 ）の少なくとも1つの異性体の、腫瘍組織増殖及び腫瘍組織の血管形成を予防し、緩和し、又は抑制するための薬剤の調製への使用。
3. 神経膠腫の治療への請求項1に記載の使用。
4. 上記イノシトール三リン酸の異性体が塩の形態をとっている、請求項1乃至3のいずれか1つに記載の使用。
5. 上記イノシトール三リン酸が、ナトリウム、カリウム、カルシウム、又は亜鉛の塩となっている、請求項4に記載の使用。
6. 上記薬剤が、錠剤、顆粒剤、カプセル、溶液又は懸濁液を含む単位剤形をとっている、請求項1乃至5のいずれか1つに記載の使用。
7. 上記イノシトール三リン酸が、D-ミオ-イノシトール-1, 2, 6-三リン酸である、請求項1乃至6のいずれか1つに記載の使用。

【発明の詳細な説明】

イノシトール三リン酸の薬剤調製への使用

この発明は、転移抑制 (antimetastatic) 効果を有する薬剤の調製に少なくとも1種のイノシトールトリスホスフェート (inositoltrisphosphate : IP_3 、以下イノシトール三リン酸という) の異性体を使用することに関する。

腫瘍性疾患は、限定された数の特定の遺伝子、即ち、癌遺伝子及び腫瘍サプレッサ遺伝子における改変の結果として細胞の単一クローンに生じる一連の進行性の遺伝的な事象として定義することができる。例えば、肺癌、結腸癌、及び乳癌においては、一貫した染色体異常が観察される。このように、腫瘍性疾患は、複数の遺伝的变化の蓄積の結果として理解することができる (E. Solomon et al.、Science、254、1153～1160頁、1991年)。

腫瘍性疾患の重大なものの1つは、脳腫瘍または神経膠腫である。人間では、神経膠腫は原発性頭蓋内腫瘍 (新生物) (primary intracranial neoplasms) の60%以上を占めている。神経膠腫は、ごく一般的にはアストロサイトの悪性トランスフォーメーションから生じるが、このようなものは、組織病理学的基準によればアストロサイトーマ (低グレードの神経膠腫又は膠芽腫、または高グレードの神経膠腫) として分類されている。膠芽腫は、高細胞密度、細胞多形性、有糸分裂、柵状細胞 (palisading cells) をともなう壊死、および、内皮細胞の増生 (proliferation) による著しい血管新生 (vascularisation) を特徴とする腫瘍である。

膠芽腫は、しばしば新しい治療法を発達させる際のモデル腫瘍として理解されている。

腫瘍組織内の悪性腫瘍細胞の生体内での進行性増殖は、腫瘍組織内に適切な血液供給系が形成された後のみに可能となる。このような系は、新しい腫瘍微細血管の発生だけでなく既存の宿主血管が腫瘍組織に入り込むことによっても形成される。人間の癌における血管構造網 (vasculature network) は、このような悪

性組織系の存在にとって必須のものである。腫瘍の血管構造網は、生命維持に必

要な栄養素を癌細胞に供給し、また、細胞から生じた老廃物を除去することが出来る。腫瘍組織の血管新生は、腫瘍細胞の増生にも明らかに影響している。例えば、血管付近の腫瘍細胞は、血管から離れたところにある同じ腫瘍細胞よりも増殖速度が大きい。

血管形成 (angiogenesis) は、血管生成プロセスの中心をなすものである。生殖及び組織の発達を含む通常の生理学的活動においては、血管形成は、短い期間だけ活性化されてその後は完全に抑制されるというように高度に調節されている。しかし、多くの疾患では、血管形成活動の調節が狂ってしまっている。血管形成活動が完全に調節されなくなり、その速度が上昇する場合もある。

血管形成活動は、人体における腫瘍細胞の増生の中心をなすものである。血管形成による新しい血管の発達は、急速であることが多く、このプロセスに非常に効果的な手段をもたらす。この新しい血管は、腫瘍細胞が人間の循環系に入り、ついには肝臓、肺、骨等の離れた部位に転移するときの通路となる (J. Folkman, Y. Shing, J. Biol. Chem., 267, 10931~10934頁、1992年)。

健康な細胞が悪性腫瘍細胞となる境界線上にあるとき、その細胞の周りの組織によって、発達中の細胞の増殖に必要な栄養供給用の血管構造を得るために血管形成による血管の生成が誘発されなくてはならない。このような場合、血管形成は、一方では血管構造の成長を促進し、他方では血管構造の成長を抑制する局所的因子間のバランスによって制御される。大抵の正常組織では、局所因子の抑制作用が血管形成プロセスを支配しており、このような組織から取り出される細胞は、一般的に血管形成を促進しない。

しかし、多くの病理学的状況において、調節されていない血管形成により疾患が引き起こされ、また広がるようである。このような異常な、調整されていない血管形成活動の主要な例として、充実性 (solid) 腫瘍の増生及び転移がある。

生体内の腫瘍は、宿主が、基質と、新生物細胞集団の増殖および生存に必要な血管網とを生じる場合しか形成されない。

基質は、(a) 一時的な (provisional) フィブリンゲルマトリクス、(b)

新しい血管、(c)炎症細胞、(d)結合組織から構成されている。悪性増殖は、一般的に腫瘍と免疫系及びホメオスタシス系との間の複雑な相互作用に依存することが知られている。

細胞の微視的凝集をこえた充実性腫瘍の増殖には、悪性細胞に栄養素と酸素を供給する血管網の発達が必要である。新しい血管構造から供給される付加的な栄養素と酸素によって、トランスフォーム細胞集団が異形成増殖 (dysplastic growth) し、これによって今度はさらに血管の発達が促進される。腫瘍細胞の分化、突然変異及び選択がこのサイクルを通じて生じ、このプロセスの最終的な結果として立体的な腫瘍が形成される。このような腫瘍は、例えば、局所的に侵入性又は転移性、またはその両方である。

原発性及び転移性腫瘍の発達においては、異なる程度の生合成と分解によって特徴付けられた悪性細胞により調節された腫瘍の細胞外マトリクスの継続的な改造作用が観察されている (Iozzo, R. V. and Cohen, I, 1993年、Dvorak, H. F. 他、1992年)。

通常、充実性、特に、腹水症の腫瘍増殖には、体液の異常蓄積が伴う。腹水液の生成は、微小血管の透過性の急速な増大により起こりうる。動物実験研究及び人体臨床研究での観察によれば、腹水液の蓄積は、腹膜腔やその他の空洞のライニングを形成する血管の透過性の変化に起因すると思われる。腹水癌のモルモット (guinea pig)、ハムスタ、及びマウスの腹膜腔のライニングを形成する血管は、対照動物の同種の血管よりも非常に大きい透過性をはっきり示している。透過性増大活動に関連する分泌は腫瘍組織によく見られる特徴であると考えられ、また、これは、例えば、腫瘍 (新生物) 性疾患における体液の異常蓄積に寄与している。

充実性であれ、その他密なものであれ、腫瘍組織は全て様々な種類の細胞からなるものであり、分離した環境に生存している個別の細胞からなるものではない。

腫瘍性疾患には100以上の様々な病気がある。これらの各々に2～4の段階があり、また、各々を、組織学的基準と酵素学及びその他の研究成果に基づいて

、より小さな、多かれ少なかれ重症である亜型 (subtypes) に分類することができる。これらの異なる段階及びサブセットの全てが、治療法及びその組み合わせのターゲットとなりうる。このような治療法には、化学療法、ホルモン療法、放射線療法、サイトカイン療法、及び手術がある。

一般に「化学療法」という用語は細胞障害性物質 (cytotoxic agents) を使用することをいうが、実際にはこの用語は、通常の臨床治療に使用する30以上の全く異なる細胞障害性物質をいうことに注意することは重要である。また、細胞障害性物質を単独であるいは互いに組み合わせて投与する際に、それが非常に急勾配の用量及び反応曲線を示すことを心に止めておくことも重要である。最も細胞障害性の高い薬品の用量及び反応曲線はその毒性及び有効性レベル曲線と一致するので、治療においてこれらの物質の殆どは、その耐性 (tolerability) の最大レベルに近い用量で使用されている。その結果、細胞障害性薬品の有害な副作用を避けることが難しい。また、個々の患者の薬品代謝及び容量反応関係の不一致によって、状況はさらに問題の多くはらむものとなっている。

過去数十年間で、細胞障害性薬品は、新生物性疾患の治療手段としてますます一般的になってきており、また、臨床癌治療にとっても貴重なものになってきている。多様な新生物細胞集団の腫瘍細胞代謝の異種性 (heterogeneity) を抑えるため、上記治療物質の多くは組み合わせて使用されることが多い。癌の化学療法では、ほとんど、このような多剤併用 (polypharmacy) が通例である。また、今日、多くの抗癌薬は本質的にはその選択細胞障害性効果を発揮するために代謝活性化を必要とするプロドラッグであることも明らかである。

多くの細胞障害性物質は、標的細胞に関してはそれほど選択的ではない。すなわち、これらの物質は正常で健全な細胞に対しても細胞障害性を有している。

抗腫瘍薬治療法は、急速に分裂する細胞を標的にすることによって選択的に機能する。しかし、臨床上の経験から、多くの治療耐性 (treatment-resistant) 癌が非常に急速に広がるのに対して、治癒可能な癌の多くが比較的遅い速度で増殖することがわかっている。

最近の研究が示すところによれば、抗腫瘍薬の最も重要な効果の1つが腫瘍細胞にアポトーシス (apoptosis) を誘発させることであると考えられる。アポト

ーシスとは、細胞内の特異な形態学的かつ生化学的变化によって定められる遺伝的にコード化され、活性化される細胞死プログラムである。アポトーシスの誘発は多数の因子によって調節されている。これらの因子には、例えば、シグナル伝達 (signal transduction) の細胞内媒介物 (intracellular mediators)、核タンパク質による遺伝子発現のモジュレーション、DNA複製、及び細胞周期がある。

腫瘍性疾患の治療のための別のアプローチとして、血管形成抑制薬 (angiosuppressive agents) が開発されてきた。しかし、可能性のある血管形成抑制薬のほとんど全てについて、人体での耐性が概して低すぎるため、臨床的に使用するには非常に毒性が高いことが証明された。

癌研究の主要な焦点は、個々の癌細胞とその代謝にある。しかし、癌細胞とその周囲の環境との共生的関係については、あまり注目されてこなかった。

要約すると、有害な副作用のない新規で効果的な抗腫瘍剤が必要とされている。

理想としては、新しい抗腫瘍剤は以下の基準を満たす必要がある。すなわち、(a) 特に腫瘍組織に対して作用するものであること、(b) 有害な副作用のないこと、(c) 目的が単一の腫瘍細胞の破壊ではなく腫瘍組織の増殖メカニズムの阻害であるので新規な物質が制癌剤 (cytostatica) でなくてもよいこと、(d) 腫瘍組織の血管形成を防止することができること、(e) 転移抑制効果を有すること、である。

この発明によれば、驚くべきことに、転移抑制効果を有する薬剤の調製にイノシトール三リン酸 (IP₃) の少なくとも1種の異性体を使用することが可能となった。

この発明の推奨実施例においては、この薬剤は、腫瘍組織成長及び腫瘍組織の血管形成の予防、緩和、及び抑制に使用することを目的としたものである。

この発明は、例えば下記の病気、すなわち、

神経膠腫、膠芽腫、カポジ肉腫等の肉腫、前立腺癌、結腸腺癌、膵臓癌、乳癌、肺小細胞癌等の肺癌、ヒト組織球性リンパ腫 (human histiocytic lymphoma) 及び黒色腫、

の予防、緩和、又は抑制に IP_3 の少なくとも1種の異性体を使用することに関するものである。

本発明の薬剤は、上記の病気に対して効果を有するだけでなく、腫瘍増殖、特に充実性腫瘍の増殖に関する他の病気にも有効である。

この薬剤は、高い転移抑制効果を発揮するが、副作用がない。従って、患者にとって非常に有益である。

ヨーロッパ特許第179439号によれば、少なくとも1種のイノシトール三リン酸の異性体を、薬効成分として含んでいる薬剤組成物が知られている。この特許では、薬剤組成物の効果が血小板凝集等の異なる分野に対して示されている。

IP_3 の生成及びその異なる異性体の単離については、米国特許第4,777,134号に開示されている。また、 IP_3 異性体は、例えば、イノシトール及びリン源から、化学的合成法または酵素を用いた合成法によっても生成できる。さらに、 IP_3 のハイブリッドDNA技術を含む微生物学的生成方法も適している。

IP_3 及びその種々の異性体の構造は、米国特許第4,735,936号及び米国特許第4,797,390号に開示されている。

この発明により使用される薬剤は、単位剤形 (unit dosage form) で存在することが適切である。このような単位剤形に適した投与形態は、錠剤、顆粒剤あるいはカプセルである。また、錠剤及び顆粒剤に対しては、胃中で制御できない加水分解が起こらないようにし、腸内で所望の吸収がなされるように、エンテリックコーティング等の表面処理を容易に行うことができる。他の適切な投与形態としては、緩速放出投与 (slow release) 及び経皮吸収投与 (transdermal administration) がある。この薬剤には、薬学的に許容できる通常の添加剤、賦形剤、及び／または、担体が含まれていてもよい。また、錠剤または顆粒剤の腸内での分解を容易にする崩壊剤が、錠剤または顆粒剤に含まれていてもよい。所定の場合、特に、急性の場合には、静脈投与用として溶液の単位剤形を使用することが好ましい。他に、投与形態としてこの化合物を含む懸濁液を用いることが好ましい場合もあり得る。

また、この薬剤は、添加剤、賦形剤、または担体を使用せずに、 IP_3 等だけ

で構成されるようにすることもできる。

必要であれば、この薬剤に、他のイノシトール磷酸類 (inositol phosphates) IP_1 、 IP_2 、 IP_4 、 IP_5 及び IP_6 が含まれないようにすることができる。従って、 IP_3 異性体の混合物が、例えば、93～100%、好ましくは、95～100% というように90～100%の純度を有していてもよい。

あるいは、この薬剤は、各々が実質的に純粋な形態で存在する1以上の特定の IP_3 異性体から構成されるか、又はこれを含むものとすることができる。すなわち、異なる異性体を実質的に純粋な形態で互いに単離することができる。この実質的に純粋な形態とは、異性体が、例えば、82～100%や85～100%、好ましくは90～100%というような80～100%の純度を有していることを意味するものである。異性体を純粋な形態で生成することができるため、当然、これらの異性体をどのような比率でも混合することができる。

この薬剤は IP_3 から構成され得るものであり、この IP_3 は IP_6 、 IP_5 又は IP_4 の少なくとも1つと、 IP_3 を形成するのに適した酵素等の分解性物質によって生成される。

大抵の場合において、この発明による薬剤の調製に使用される1または複数の IP_3 異性体は、ミネラルバランスに悪影響を及ぼさないように塩の形態で存在することが適切である。この塩は、ナトリウム、カリウム、カルシウム、亜鉛、又はマグネシウムの塩か、これらの塩の2種類以上を組み合わせた混合物からなるものであることが好ましい。

また、上記した理由により、この薬剤に、カルシウム、亜鉛又はマグネシウムと鉍酸又は有機酸との塩のうち少なくとも1種類の薬学的に許容できる塩を余分に添加するとよい。このことは、特に、上記のミネラルが不足しがちな高齢者に有益である。

人間の患者に薬剤投与する場合には、薬剤を様々な量で動物に投与して得られた結果に基づいて、当業者により適切な服用量が常套的に決められる。人間に対する推奨服用量は、0.1～1000 mg IP_3 /日/kg体重の範囲内であり、特に、0.1～200 mg IP_3 /日/kg体重である。

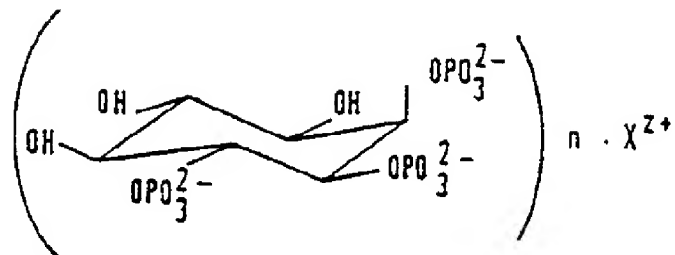
動物実験では、マウスに腹膜腔内注射で160 mg/kg体重という非常に大

きい投薬量の IP_3 を投与した後でも、何ら毒性作用は見られなかった。

通常、この薬剤は、1回の投薬量について、例えば、0.05～1.3g、好ましくは、0.1～1gというように、0.01～1.5gの IP_3 を含んでいる。

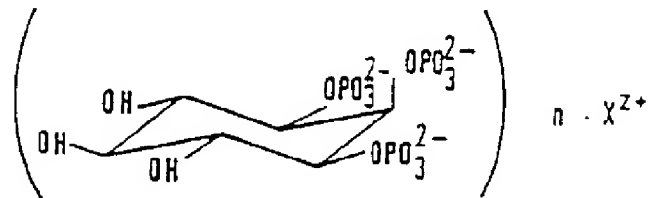
この発明により使用される組成物は、主要な IP_3 異性体もしくは上記した異性体に対応する以下の物質の少なくとも1つ、場合によっては、2以上の物質を含んでいる。即ち、

次式のD-ミオ-イノシトール-1, 2, 6-三リン酸



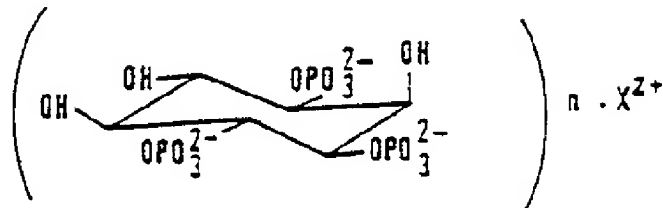
ここでXは、水素、少なくとも1つの一価、二価又は多価のカチオン、又はその組み合わせであり、nはイオンの数であり、zは各イオンの電荷である。

次式のリ-ミオ-イノシトール-1, 2, 3-三リン酸



ここでX、n及びzは上記したとおりである。

次式のL-ミオ-イノシトール-1, 3, 4-三リン酸

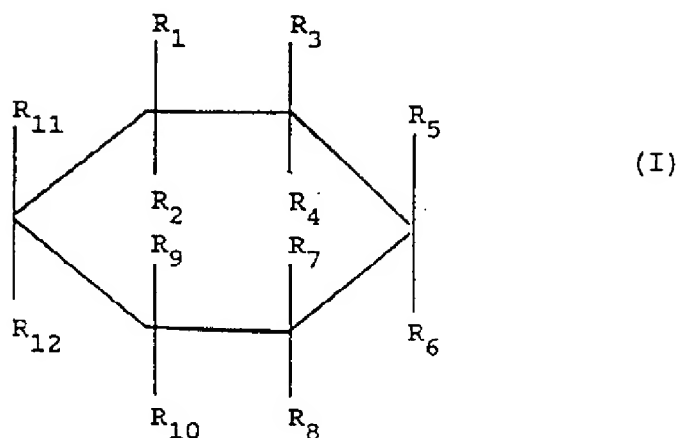


ここでX、n及びzは上記したとおりである。

上記の各式において、nの範囲は1～6であり、zの範囲は1～6である。好

ましくは、 n は3～6であり、 z は1、2、又は3である。また、上記の異性体のうち、D-ミオ-イノシトール-1, 2, 6-三リン酸が好ましい。

本願発明において組成物中の有効なIP₃成分として利用できる他のイノシトール三リン酸異性体は、以下の構造式を有している。



イノシトール三リン酸化合物の1つの群は、上記構造式(I)によって定められる。ここで、 R_1 、 R_3 、 R_5 、 R_7 、 R_{10} 及び R_{11} のうちの3つが水酸基であり、残りの3つがリン酸基(ホスフェート基)である。また、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_8 、 R_9 及び R_{12} は水素である。

イノシトール三リン酸の別の1群は、上記構造式(I)によって定められるが、 R_1 、 R_3 、 R_6 、 R_7 、 R_9 及び R_{12} のうちの3つが水酸基で、残りの3つがリン酸基である。また、 R_2 、 R_4 、 R_5 、 R_8 、 R_{10} 及び R_{11} は水素である。

イノシトール三リン酸のさらに別の1群は、上記構造式(I)によって定められるが、 R_1 、 R_3 、 R_5 、 R_8 、 R_{10} 及び R_{12} のうちの3つが水酸基で、残りの3つがリン酸基である。また、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_9 及び R_{11} は水素である。

イノシトール三リン酸のさらに別の1群は、上記構造式(I)によって定められるが、 R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_8 、 R_9 及び R_{12} のうちの3つが水酸基で、残りの3つがリン酸基である。また、 R_2 、 R_3 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 及び R_{11} は水素である。

イノシトール三リン酸のさらに別の1群は、上記構造式(I)によって定められるが、 R_1 、 R_3 、 R_6 、 R_8 、 R_9 及び R_{12} のうちの3つが水酸基で、残りの3つがリン酸基である。また、 R_2 、 R_4 、 R_5 、 R_7 、 R_{10} 及び R_{11} は水素である。

イノシトール三リン酸のさらに別の1群は、上記構造式(I)によって定められるが、 R_1 、 R_3 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 及び R_{12} のうちの3つが水酸基で、残りの3つがリン酸基である。また、 R_2 、 R_4 、 R_5 、 R_8 、 R_9 及び R_{11} は水素である。

イノシトール三リン酸のさらに別の1群は、上記構造式(I)によって定められるが、 R_1 、 R_3 、 R_5 、 R_8 、 R_{10} 及び R_{11} のうちの3つが水酸基で、残りの3つがリン酸基である。また、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_9 及び R_{12} は水素である。

最後に、イノシトール三リン酸の別の1群は、上記構造式(I)によって定められるが、 R_1 、 R_3 、 R_5 、 R_7 、 R_9 及び R_{11} のうちの3つが水酸基で、残りの3つがリン酸基である。また、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_8 、 R_{10} 及び R_{12} は水素である。

上記式から予想される範囲内の特定のイノシトール三リン酸化合物には、上記構造式(I)を有しかつ下記の構成をもつ化合物がある。即ち、構造式(I)において、

R_5 、 R_7 、 R_{10} がリン酸基であり、 R_1 、 R_3 、 R_{11} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} が水素であるもの、

R_1 、 R_{10} 、 R_{11} がリン酸基であり、 R_3 、 R_5 、 R_7 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_{11} がリン酸基であり、 R_5 、 R_7 、 R_{10} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} が水素であるもの、

R_3 、 R_5 、 R_7 がリン酸基であり、 R_1 、 R_{10} 、 R_{11} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} が水素であるもの、

R_3 、 R_7 、 R_{10} がリン酸基であり、 R_1 、 R_5 、 R_{11} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} が水素であるもの、

R_3 、 R_{10} 、 R_{11} がリン酸基であり、 R_1 、 R_5 、 R_7 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_6 がリン酸基であり、 R_7 、 R_9 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_5 、 R_8 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_6 、 R_7 、 R_9 がリン酸基であり、 R_1 、 R_3 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_5 、 R_8 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_3 、 R_5 、 R_8 がリン酸基であり、 R_1 、 R_{10} 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_9 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_{12} がリン酸基であり、 R_5 、 R_8 、 R_{10} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_9 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_5 がリン酸基であり、 R_8 、 R_{10} 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_9 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_5 、 R_8 がリン酸基であり、 R_3 、 R_{10} 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_9 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_5 、 R_{12} がリン酸基であり、 R_3 、 R_8 、 R_{10} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_9 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_{12} がリン酸基であり、 R_6 、 R_8 、 R_9 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_5 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_6 がリン酸基であり、 R_7 、 R_{10} 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_5 、 R_8 、 R_9 、 R_{11} が水素であるもの、

R_4 、 R_5 、 R_8 がリン酸基であり、 R_1 、 R_9 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、

R_2 、 R_3 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_3 、 R_5 、 R_8 がリン酸基であり、 R_1 、 R_{10} 、 R_{11} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_9 、 R_{12} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_5 がリン酸基であり、 R_8 、 R_{10} 、 R_{11} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_9 、 R_{12} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_5 がリン酸基であり、 R_7 、 R_9 、 R_{11} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_8 、 R_{10} 、 R_{12} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_{12} がリン酸基であり、 R_5 、 R_8 、 R_9 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_8 がリン酸基であり、 R_5 、 R_9 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_3 、 R_5 、 R_{12} がリン酸基であり、 R_1 、 R_8 、 R_9 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_5 、 R_9 が磷酸基であり、 R_3 、 R_8 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_5 、 R_{12} が磷酸基であり、 R_3 、 R_8 、 R_9 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_3 、 R_9 が磷酸基であり、 R_5 、 R_8 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_3 、 R_5 、 R_9 が磷酸基であり、 R_1 、 R_8 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_5 、 R_9 、 R_{12} が磷酸基であり、 R_1 、 R_3 、 R_8 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_8 、 R_9 が磷酸基であり、 R_3 、 R_5 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_8 、 R_{12} が磷酸基であり、 R_3 、 R_5 、 R_9 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_5 、 R_8 、 R_{12} が磷酸基であり、 R_1 、 R_3 、 R_9 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_1 、 R_9 、 R_{12} が磷酸基であり、 R_3 、 R_5 、 R_8 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_5 、 R_8 、 R_9 が磷酸基であり、 R_1 、 R_3 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_3 、 R_8 、 R_9 が磷酸基であり、 R_1 、 R_5 、 R_{12} が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_3 、 R_9 、 R_{12} が磷酸基であり、 R_1 、 R_5 、 R_8 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

R_3 、 R_8 、 R_{12} が磷酸基であり、 R_1 、 R_5 、 R_9 が水酸基であり、かつ、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、

及び、

R_8 、 R_9 、 R_{12} が磷酸基であり、 R_1 、 R_3 、 R_5 が水酸基であり、かつ、 R_2 、

R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_{10} 、 R_{11} が水素であるもの、である。

上記式は、イノシトールが、ミオ-イノシトール、シス-イノシトール、エビ-イノシトール、アロ-イノシトール、ネオ-イノシトール、ムコ-イノシトール、カイロ-イノシトール及びシロ-イノシトールからなる群から選択されたものである、イノシトール三リン酸の特定の異性体を示している。また、この発明は、以下の例によっても説明されるが、これに限定されるものではない。例1は、静脈投与用の IP_3 溶液の生成を示すものであり、例2は、ヌードマウスにおける神経膠腫瘍組織の腫瘍増殖を抑える IP_3 の効力を示すものである。ヌードマウスは、人体での効果に対して高い相関関係を有する十分な生体内実験を行うために、ヒトの異種移植片の移植及び繁殖(propagation)に広範囲に使用されてきたものである。

人体の状態に関する動物実験による予測をより確実にするために、ヒトの腫瘍の異種移植ができる重症複合型免疫不全症(SCID)マウスを利用した。例3は、前立腺腫瘍に関する実験における IP_3 の転移抑制効果を示すものであり、例4は、肺腫瘍に関する実験における IP_3 の血管形成抑制効果を示すものである。

例 1

D-ミオ-イノシトール-1, 2, 6-三リン酸(IP_3)のナトリウム塩の注射溶液

IP_3 のナトリウム塩0.5gと塩化ナトリウム0.77gを98.73mlの注射用の水に溶解させて、人間又は動物への注射に適した溶液を生成した。

例 2

37℃の5%CO₂湿潤雰囲気において、15%の熱不活性化ウマ血清と2.5%の熱不活性化ウシ胎児血清とを補足した培地でラットの膠細胞を静的懸濁培養(stationary suspension culture)にて増殖させた。

トリプシン溶液を用いて細胞を収集し、細胞濃度を測定した。細胞を遠心分離し、再懸濁させて100万個細胞/mlの濃度にした。

生後12週間（体重20～25g）の12匹の雄のSPF（specific pathogen free）マウスを、装置の水平空気流キャビネットのフィルタトップに特殊フィルタを備えたオートクレーブ処理されたケージで養育した。オートクレーブ処理された寝床、放射線照射処理した餌、及び無菌の水を使用した。温度及び湿度は、一定的に、 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 及び相対湿度 $65 \pm 5\%$ に維持した。

最初の日（0日目）に各マウスの右脇腹に0.1mlの細胞懸濁液を皮下接種した。

5日後、浸透性小型ポンプ（ALZET社製）を外科手術的に7匹のマウスの皮下に入れ、また、疑似手術した（shamoperated）5匹を対照グループとした。

各小型ポンプには、1.0g/2.5mlの1-D-ミオイノシトール-1,2,6-三リン酸（ IP_3 ）のナトリウム塩溶液が約200 μl が入っており、この小型ポンプにより IP_3 が14日間連続投与された。

神経膠腫細胞をマウスに注射すると腫瘍が増殖する。腫瘍の増殖を、2つの直交する軸に沿った2つの直径を測定することによって調べた。実際の腫瘍径は測定した径から0.5mm（皮膚厚）を差し引いたものとした。腫瘍領域（A）を2つの実際腫瘍径を乗算して計算し、腫瘍体積を式： $\pi/6 \times A^{3/2} \times 0.67$ により計算した。得られた腫瘍体積を以下の表に示す。

腫瘍体積（ mm^3 ）		
日数	IP_3 処置	対照
0	0	0
10	115	230
13	270	580
15	620	1190
17	880	2230
20	2420	4270

この結果から、 IP_3 が神経膠腫細胞によって誘発された腫瘍組織の増殖を抑える非常に顕著な効果を有することがわかる。

例3

例2に記載した手順と同様の手順で、マウスに特定の細胞種を皮下注射して前立腺腫瘍増殖を誘発させた。1つのグループのマウスに浸透性小型ポンプによってIP₃を与え、別のグループのマウスを対照として用いて、腫瘍増殖を調べた。腫瘍体積を以下の表に示す。

腫瘍体積 (mm ³)		
日数	IP ₃ 処置	対照
0	0	0
7	3.6	5.2
10	6.2	13.0
17	5.1	48.1
24	9.5	63.8
28	17.1	101.6
35	21.5	113.2

この例では、IP₃の投与によって前立腺腫瘍組織の増殖が著しく低減された。

例4

37℃の5%CO₂湿潤雰囲気において、10%の熱不活性化ウシ血清を有する4.5g/lのグルコースを有する培地でルイス肺癌細胞(ATCC CRT-1642)を懸濁培養にて増殖させた。この細胞を、細胞懸濁液を1:6に希釈して継代培養した。遠心分離及び再懸濁により収集した後、細胞を計数器で計数した。細胞を培地により再懸濁させ、1000万個細胞/mlの濃度にした。

生後6週間の10匹の雄のSPFマウスを、防護装置のフィルタトップにHEPA (high efficiency particulate air) フィルタを備えたオートクレーブ処理されたケージで養育した。オートクレーブ処理された寝床、放射線照射処理した餌、及び無菌の汙過処理水を使用した。温度及び湿度は、一定(22±2℃、相対湿度65±5%)に維持した。

最初の日(0日目)に各マウスの右脇腹に0.1mlの細胞懸濁液を皮下接種した。15日後、浸透性小型ポンプ(ALZET社製)を外科手術的に5匹のマ

ウスの皮下に入れ、また、疑似手術した別の5匹を対照グループとした。

各小型ポンプには、 0.4 g/ml の1-D-ミオーイノシトール-1, 2, 6-三リン酸 (IP_3) のナトリウム塩溶液が $226 \mu\text{l}$ が入っており、この小型ポンプにより IP_3 が6日間連続投与された。

肺癌細胞をマウスに注射すると肺組織における血管形成及び腫瘍の形成が起こる。試験後の肺の重量により、形成された腫瘍組織の量の測定を行うこととする。疑似手術したマウスでは、平均肺重量が 0.312 g であり、一方、 IP_3 で処置したマウスの平均肺重量は 0.198 g であった。さらに、組織学的検査から IP_3 で処置したマウスの血管形成は少ないことがわかった。このように、 IP_3 での治療によって、腫瘍組織が縮小し、血管形成が減少する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 95/01585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: A61K 31/66, C07F 9/117

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: A61K, C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS-ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4952396 A (ROBERT SABIN ET AL.), 28 August 1990 (28.08.90), SEE ESPECIALLY CLAIM 7 --	1-7
X	US 4590060 A (UDO EHRENFELD), 20 May 1986 (20.05.86), SEE ESPECIALLY COLUMN 12 LINES 22-27 -- -----	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 April 1996

Date of mailing of the international search report

16.04.96

Name and mailing address of the ISA/

Swedish Patent Office

Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM

Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Göran KARLSSON

Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 95/01585

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-	4952396	28/08/90	NONE	
US-A-	4590060	20/05/86	AU-B,B- 560178	02/04/87
			AU-A- 3332784	04/04/85
			CA-A- 1234754	05/04/88
			DE-A,C,C 3334751	11/04/85
			DE-A- 3336583	25/04/85
			DK-B- 168755	06/06/94
			EP-A,A,A 0142641	29/05/85
			SE-T3- 0142641	
			EP-A- 0350973	17/01/90
			JP-C- 1864299	08/08/94
			JP-A- 60155123	15/08/85
			US-A- 5021234	04/06/91

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN